云 南 植 物 研 究 2007, 29 (1): 91～97
Acta Botanica Yunnanica

麻花艽和管花秦艽 (龙胆科) 之间自然杂交类型的分子验证*

李小娟[1,2], 王留阳[1,2], 杨惠玲[1,2], 刘建全[1**]
(1 中国科学院西北高原研究所, 青藏高原生物进化与适应开放实验室, 青海 西宁 810008;
2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 野外考察发现麻花艽 (*Gentiana straminea* Maxim.) 和管花秦艽 (*G. siphonantha* Maxim. ex Kusn.) 同域分布时存在大量形态位于二者之间的个体。经形态变异研究后发现它们可能是这两个物种之间的杂交后代。对两个亲本种以及假设杂交群体共 55 个个体的核糖体 *ITS* 序列和叶绿体 *trn*S-G 序列的分析结果表明: 中间形态个体是麻花艽和管花秦艽的自然杂交后代。此外分析了两个亲本种以及杂交群内个体间 *trn*S-G 和 *ITS* 序列的变异状况以及分子标记结果与形态鉴定不一致的可能原因; 指出可能是杂交诱导的叶绿体基因组重组以及早期物种分化中的谱系筛选不彻底等原因造成了亲本种群体内序列变异的多样化。

关键词: 麻花艽; 管花秦艽; 自然杂交; *ITS*; *trn*S-G
中图分类号: Q 943.2　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0253-2700 (2007) 01-091-07

Confirmation of Natural Hybrids between *Gentiana straminea* and *G. siphonantha* (Gentianaceae) Based on Molecular Evidence

LI Xiao-Juan[1,2], WANG Liu-Yang[1,2], YANG Hui-Ling[1,2], LIU Jian-Quan[1**]
(1 *Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Biological Evolution and Adaptation*, *Northwest Institute of Plateau Biology*, *Chinese Academy of Sciences*, Xining 810008, China; 2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100039, China)

Abstract: A few individuals with intermediate morphology always appear in the sympatric distributions of *Gentiana straminea* and *G. siphonantha*. These intermediate individuals were hypothesized to be the hybrids of two species after a careful evaluation of their morphological characters. To test this hypothesis, the sequence comparison of the internal transcribed spacer (*ITS*) regions of nuclear ribosomal and *trn*S (GCU)-*trn*G (UCC) intergenic spacer region of the chloroplast DNA from *Gentiana straminea*, *G. siphonantha*, and the putative hybrids was performed. The results suggested that most intermediate individuals were the natural hybrids between *G. straminea* and *G. siphonantha*. In addition, we examined the sequence variation among the individuals of both parent species and provided the possibility leading to the incongruent identification to some individuals by morphology and molecular evidences respectively. The intraspecific diversification of DNA fragments within both parent species and their high variability in hybrid swarms probably resulted from chloroplast genome recombination and incomplete lineage sorting during the early stage of speciation origin of parent species.

Key words: *Gentiana straminea*; *G. siphonantha*; Hybrids; *ITS*; *trn*S-G

---

* **基金项目**: 国家自然科学基金项目 (30572329) 资助
** **通讯作者**: Author for correspondence; E-mail: liujq@nwipb.ac.cn
收稿日期: 2006-04-16, 2006-09-18 接受发表
作者简介: 李小娟 (1970-) 女, 硕士, 主要从事植物分子系统学研究。

杂交是植物进化最为重要的驱动力，不仅能为植物抵抗不良环境、占领新生境提供遗传基础，更为重要的是，杂交、特别是异源杂交多倍化是新物种形成、多样化（diversification）的重要机制之一（Arnold，1997；Arnold 等，2003；Rieseberg 等，1998）。生殖隔离和独立的遗传谱系（lineage）是植物“种”的基本特性之一（Rieseberg 等，2006），但部分亲缘物种之间的生殖隔离不是十分彻底，从而导致天然杂交在自然界十分普遍（Stebbins，1959；Grant，1981）。研究杂交形成的物种（species）、杂种（hybrids）、特别是研究两个物种同域分布时存在的杂交带（hybrid zone）已经成为近年来植物系统与进化研究的热点领域（Ellstrand 等，1996；Rieseberg，2003）。一些形态上的中间性状，可能是由于趋同或者环境选择造成的变异，并不是完全由于杂交造成的；相反，一些形态上并不是介于两个亲本种的个体，则有可能是杂交渗入造成的（Rieseberg 等，1995，1999；Schwarzbach 等，2001；Lexer 等，2003；Rauscher，2002）。近年来，利用分子生物学手段不断在以前未记载的属中发现种之间自然杂交现象的存在（Koch 等，2003；Tsukaya 等，2003）杂交带的遗传组成和基因流状况还为阐明物种之间的隔离机制提供了一个比较好的研究界面（Arnold，1997）。

龙胆属（*Gentiana*）含 15 组、362 个种，主要分布在中国西南山地（Ho and Liu，2001）。龙胆属内的杂交现象报道较少（Pringle，1966；Mansiona 等，2004。麻花艽（*G. straminea* Maxim.）和管花秦艽（*G. siphonantha* Maxim. ex Kusn.）是秦艽组（sect. *Cruciata* Gaudin）内的两个形态近缘种。它们之间的主要区别是前者二歧聚伞花序，花冠黄绿色、漏斗形、花萼筒长 15～28 mm；后者顶生花序簇生呈头状，花冠深蓝色、筒状钟形、花萼筒长 4～6 mm（Ho and Liu，2001）。麻花艽生长在 2 000～4 950 m 的高山草甸、多石干山坡与灌丛中，西藏、青海、甘肃、四川等地均有分布；管花秦艽则生于 1 800～4 500 m 的干草原、草甸、灌丛及河滩等地，产四川西北部、甘肃、青海及宁夏西南部。研究中发现，两个物种在一些同域分布地区存在形态介于二者之间的个体，且麻花艽开花时间较管花秦艽为早，二者存在较长时间的花期重叠（未发表数据）。我们详细调查了同域分布区中间形态特征的个体，发现它们的形态变异较大，但花序以及花冠的特征位于麻花艽与管花秦艽之间，如花序介于簇生与聚伞花序之间，花冠形状为宽漏斗，花萼筒长 8～12 mm，特别是花的颜色既非深蓝色也非黄绿色，而是紫色。调查中发现该地区无另外的秦艽组物种分布，但有其它龙胆属植物生长，这些种类不与中间类型个体的花期重合，并且中间类型个体具有典型的秦艽组形态特征：单轴分枝，莲座丛叶位于植株中心，基部被枯存的纤维状叶鞘包裹（Ho and Liu，2001）；因而推测它们应是麻花艽与管花秦艽的自然杂交后代。我们最近的研究表明，秦艽组存在快速成种的现象，种之间的分化较小、生殖隔离可能不彻底（Zhang 等，in press）；因而进一步暗示过渡形态的个体应该是两个物种相互之间杂交渗入造成的。

比较杂交个体与亲本种之间在母系以及双亲遗传的 DNA 组成、分化和基因树，能很好鉴别杂交个体以及它们的父母亲本来源（Koch 等，2003）；Arnold（1997）、Rieseberg 等（1998，2003）以及 Arnold 等（2003）总结了这方面的研究进展。首先，需要利用母系遗传的标记来区分两个假设亲本物种并确定杂交个体的母系来源，因为叶绿体 DNA 在绝大多数被子植物中都是母系遗传（Mogensen，1996；Ferris 等，1997），常用的分子标记均是建立在该质体 DNA 差异之上的分子标记（Rieseberg 等，2003）。母系标记还可以检查杂交个体是来源于一个亲本种还是两个亲本种（Arnold，1997）；目前的研究发现大多数杂交群（hybrid swarms）都是由两个亲本种作为母本参与建成的（Rieseberg 等，2003）。在这类标记中，由于质体 DNA 的单亲遗传性质以及杂交个体相对较短的进化历史，杂交个体的基因单倍型在多数已研究的类群中都与两个亲本种完全相同（Arnold，1997）。其次，利用 ISSR、AFLP 以及双亲遗传的核基因来标记是否在杂交个体中存在来自假设父母本的特异性标记，证实形态过渡个体的杂交来源（Rieseberg 等，2003）。部分叶绿体基因或者 DNA 片段和核 *ITS* 由于引物通用、容易扩增和测序，在研究植物的种内变异以及种间关系得到了广泛应用（Wendel 等，1995；

Wang 等，2005；Liu 等，2006；王玉金等，2004；袁长春等，2004；陈生云等，2005；张茜等，2005)，这两套基因的相互补充标记因而可用来阐明杂交群体的遗传组成。本文从群体遗传学出发，对同域分布的麻花艽和管花秦艽居群以及疑似杂交个体进行群体取样进行序列测定，目的是：(1) 验证形态过渡个体是否是两个亲本种的杂交后代；(2) 如果是杂交后代，是否在两个亲本种、杂交群形成的杂交带地域存在由于杂交导致的单亲遗传基因组的泄露 (leakage) 而发生的重组或者亲本种之间的基因流。

1　材料和方法

1.1　材料来源

研究材料于 2002 年 8 月 24 日采自青海省曲麻莱县 (N: 34°06.152′; E: 96°09.841′; Alt: 4 400 m)；管花秦艽 (22)、麻花艽 (15)、疑似杂交群 (18)，个体之间的采集距离为 10 m 以上。新鲜叶片用硅胶干燥保存。凭证标本 (刘建全 961，963，964) 存于中国科学院西北高原生物研究所标本馆 (HNWP)。

1.2　DNA 提取、扩增、纯化、测序及杂交个体的鉴定

总 DNA 提取采用改进的 CTAB 法 (Doyle and Doyle, 1987)。*ITS* 区扩增使用引物“*ITS*1”和“*ITS*4” (White 等，1990)；*trn*S-G 片断扩增使用引物“*trn*S”和“*trn*G” (Hamilton，1999)。PCR 总反应体积为 25 μL：双蒸水 17.6 μL，50 mmol/L $MgCl_2$ 0.5 μL，10×tris-HCL 反应缓冲液 2.5 μL (100 mmol/L Tris-HCl pH9.0，500 mmol/L KCl，15 mmol $MgCl_2$，1% Triton X-100)，10 mmol/L dNTP 0.3 μL，5 pmol/μL 的引物各 1.25 μL，Taq 酶 0.3 μL (5 units/μL)，扩增程序为：94℃ 3 min，接以 35 个循环的 94℃ 45 s、54℃ 50 s、72℃ 1 min，最后以 72℃ 6 min 终止反应。扩增产物用 CASpure PCR 纯化试剂盒 (上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司) 纯化。纯化产物利用同样的引物和 Amersham 公司的 DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 试剂盒根据推荐的程序进行测序 PCR 扩增，产物经纯化后在 MegaBACE 500 型自动测序仪上进行测序。*ITS* 序列范围根据 GenBank 龙胆属植物 *G. frigida* 的 *ITS* 全序列确定。*trn*S-G 的序列边界参考 Hamilton (1999)。

同一居群的个体在测序后发现拥有不同的序列；或对于只有一个个体拥有的单倍型，我们进行两次以上的重复检查，以克服材料混淆、PCR 错配和测序等实验误差。对这类材料，第二次重复均得到与第一次完全相同的序列结果。另外，选择形态中间一个个体 (961-5) 的一个 ITS 扩增产物，克隆到 pGEM-T 载体中 (Promega, Madison，Wis)。挑选 10 个克隆用 T7 and SP6 进行了测序。

1.3　序列排列与数据分析

所得序列用 ClustalX 软件 (Thompson 等，1997) 进行对齐排列，并适当手工校正。所有序列均注册到 GenBank (DQ497573-DQ497593)。对 *trn*S-G 和 *ITS* 序列进行分支分析，检测不同单倍型之间最简约的进化途径；缺失 (gap) 作为 0/1 数据处理。用 PAUP* 4.0b10 中的最大简约法 (MP) (Swofford，2000) 进行分析。程序选择及参数为：启发式搜索，TBR 枝长交换，MULTARS ON，ACCTRAN 优化，100 次随机序列加入。用自展百分率表示分支支持率 (bootstrap，重复 1000 次)。

2　结果

2.1　*trn*S-G 序列分析

形态上为麻花艽所有个体的 *trn*S-G 区没有发现任何差异，序列长度为 553 bp，这类单倍型定义为 (St 型)。而形态上为管花秦艽的个体发现有 3 种单倍型 (haplotypes) (表 1)：14 个个体的序列与麻花艽 St 型相比，在第 41～65 位有一段长达 25 个碱基的缺失，在第 165～167 位点有 3 个碱基的缺失，其序列全长为 525 bp；这类单倍型是管花秦艽的主要成分 (14 个个体)，定义为 Si 型；第二种单倍型与标准的麻花艽类型存在一个碱基的替换，类似麻花艽标准单倍型，因而定义为 St-si 型单倍型，4 个个体为这一单倍型；第 3 种也是 4 个个体拥有，该类单倍型十分特殊：在 41～45，49～54 区段为缺失；但在 46～48，55～65 区段却有和麻花艽类型一样的碱基插入，但在 165～167 拥有和管花秦艽类型 (Si 型) 的缺失，其余 3 个位点的差异也与 Si 型一样，因而定义为 Si-st 型。

形态上为中间过渡类型的 18 个个体单倍型变化比较大，拥有麻花艽和管花秦艽的所有 4 种类型： (1) 11 个体拥有与麻花艽完全一样的 St 型；(2) 4 个体为 St-si 型；(3) 1 个体与标准的管花秦艽 Si 型完全一样；(3) 2 个体拥有类似管花秦艽的 Si-st 型 (表 1)。

2.2　*ITS* 序列分析

管花秦艽的所有个体都具有相同的 *ITS* 序列，未发现碱基的粘合性重叠。麻花艽所测的个体之间发现有 3 个位点变异，分别是第 58、188 和 549 位点，该 3 个位点的变异将所有的麻花艽个体区分为 3 种序列 (*ITS*-st-A，B，C)，其中

ITS-st-A 和 *ITS*-st-B 不存在粘合性重叠，而 *ITS*-st-C 在 3 个位点都存在粘合性重叠：如第 58 位点，前两种序列为 C 或者 T，而在第 *ITS*-st-C 则为 T C。除去这些位点，在管花秦艽和麻花艽之间，则分别在 *ITS*1 和 *ITS*2 区还存在 5 个位点的替换和一个 3-bp 的插入或者缺失 (表 2)。

中间形态个体的 *ITS* 变异较大：其中 1 个个体 (961 - 4) 拥有麻花艽 *ITS*-st-A 型完全一样的 *ITS* 序列；另有一个体 (961 - 6) 在两个物种的所有差异位点上都与麻花艽 (*ITS*-st-C) 相同，但第 188 位点上为 *ITS*-st-B 的 T 变异位点 (表 2)；其余个体都拥有两个物种 5 个替换差异位点中 3 个以上位点的粘合性重叠，在麻花艽存在种内变异的 3 个位点 58、188 和 549 上，存在较大的变异，或为其中的单一位点或为两个碱基的粘合性重叠。麻花艽的 3-bp 插入，在形态过渡个体中存在十分有趣的变化，大部分个体均有该插入，但在 961 (1, 9, 12, 13) 个体中两次以上的直接测序中发现：每个体的一部分序列在不同位置拥有不同的 3 个碱基缺失 (表 2)，而另一部分序列则不存在这一缺失，导致在这些个体中形成两种完全不同的拷贝序列。对其中一个体的克隆序列表明，粘合位点分别是两个亲本种序列差异碱基叠加形成的 (表 2)。

2.3 聚类分析

*Trn*S-G 序列与外类群比较，将插入或缺失都

表 1 叶绿体 *trn*S-G 变异位点、鉴定的单倍型和每种单倍型在各形态类群中的分布

Table 1 Variable sites of chloroplast *trn*S-G fragment, recovered haplotypes and the distribution of each haplotype in the morphological delimitations

类型 Type	个体编号 Individual no.	亲本和杂交型 Parents and hybrids	变异位点 Variable sites 41-45	46-48	49-54	55-65	165-167	278	444	452
St	964 (1-15) 961 (1,3,4,6,7,9-12,14,16)	*G. straminea* Hybrid	**********************				AAA	G	C	G
St-si	961 (2,5,8,18) 963 (2,6,10,12)	Hybrid *G. siphonantha*	**********************				AAA	T	C	G
Si	961 (13) 963 (3-5,7-9,11,14-19,21)	Hybrid *G. siphonantha*	--				---	T	A	T
Si-st	961 (15,17) 963 (1,13,20,22)	Hybrid *G. siphonantha*	--------	TAT	-------	/\/\/\/\/\/\	---	T	A	T

************, ATGGATATGTACACATAGATATTAT; /\/\/\/\/\/\, ATAGATATTAT

表 2 *ITS* 变异位点、鉴定的 DNA 序列和每种序列在各形态类群中的分布

Table 2 Variable sites of *ITS*, recovered sequences and the distribution of each sequence in the morphological delimitations

个体 Individual No.	亲本和杂交型 Parents and hybrids	变异位点 Variable sites 42	58	113-115	116-118	119	123-125	184	188	226	228	549
963 (1-22)	*G. siphonantha*	C	C	GTG	---	C	CAA	T	G	T	T	C
964 (1,2,3,4,6,8,9,10,11,12,14) *ITS*-st-A	*G. straminea*	A	C	GTG	TAT	G	CAA	G	G	A	G	C
964 (7, 13, 15) *ITS*-st-B	*G. straminea*	A	T	GTG	TAT	G	CAA	G	T	A	G	T
964 (5) *ITS*-st-C	*G. straminea*	A	Y	GTG	TAT	G	CAA	G	K	A	G	Y
961 (6)	Hybrid	A	Y	GTG	TAT	G	CAA	G	T	A	G	Y
961 (4)	Hybrid	A	C	GTG	TAT	G	CAA	G	G	A	G	C
961 (2, 5, 8, 15, 16, 17, 18)	Hybrid	M	C	GTG	TAT	S	CAA	K	G	W	K	C
961-2-clone 1	Hybrid	C	C	GTG	TAT	C	CAA	T	G	T	T	C
961-2-clone 2	Hybrid	A	C	GTG	TAT	G	CAA	G	G	A	G	C
961 (1, 9, 13)-i	Hybrid	M	C	---	TAT	S	CAA	K	G	W	K	C
961 (1, 9, 13)-ii	Hybrid	M	C	GTG	TAT	S	---	K	K	W	K	C
961 (12)-i	Hybrid	M	Y	GTG	TAT	S	---	K	K	W	K	Y
961 (12)-ii	Hybrid	M	Y	---	TAT	S	CAA	K	K	W	K	Y
961 (3, 10, 11, 14)	Hybrid	M	T	GTG	TAT	S	CAA	K	K	W	K	Y
961 (7)	Hybrid	M	C	GTG	TAT	S	CAA	K	K	W	K	Y

M: A/C; Y: T/C; S: G/C; K: T/G; W: A/T; i 和 ii 表示在每个体测序两次以上存在不同的拷贝序列

作为信息位点，共有信息位点 6 个，启发式搜索得到 1 棵简约性树（图 1），CI = 0.778，RI = 0.667，步长 = 9。出现在管花秦艽和中间形态个体中的 St-si 单倍型，与麻花艽中典型的 St 聚集成一支；另两个单倍型（Si 和 Si-st）为一支。简约性分析表明，在管花秦艽中发现的 St-si 单倍型显然是来源于典型的麻花艽类型（St）。尽管 Si-st 型与典型的管花秦艽成为一支，但支持率降低，支持它们成为一个单系支的共有衍征为 4 个，而 Si-st 型有两个特征与 St、St-si 形成的分支存在平行进化。

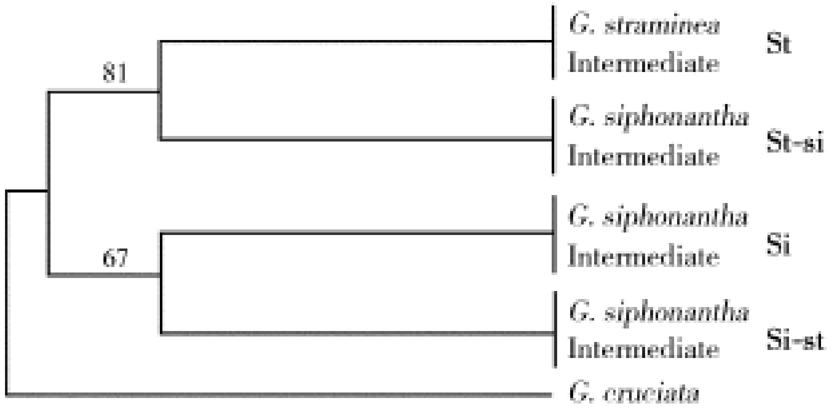

图 1　基于 *trn*S-G 序列的唯一最简约树。分支上的数据为自展分析支持率（bootstrap 值，1000 次重复）

Fig. 1　The single MP tree based on *trn*S-G sequences. Numbers above internodes are bootstrap values based on 1000 replicates

ITS 序列与外类群比较，将插入或者缺失都作为信息位点，共有信息位点 8 个，启发式搜索得到 1 棵简约树（图 2），CI = 1.000，RI = 1.000，步长 = 22。基于 *ITS* 序列矩阵得到的最大简约树上分为 2 支，中间形态个体的所有类型 (Intermediate 1 - 9) 都与麻花艽成为一支；而管花秦艽则单独聚为一支。

3　讨论

3.1　形态过渡个体应为管花秦艽和麻花艽的杂交后代

形态上位于两个典型物种之间的居群或者个体，一般认为是由于两个物种的杂交或者渗入杂交造成的（Grant，1981）；但确认是否杂交后代不仅要依靠形态方面的判断，而且还要依靠其它证据，特别是分子证据的支持（Arnold，1997）。我们对母系遗传的叶绿体 DNA 分析表明：形态过渡型个体有两个母系来源，分别来自麻花艽与

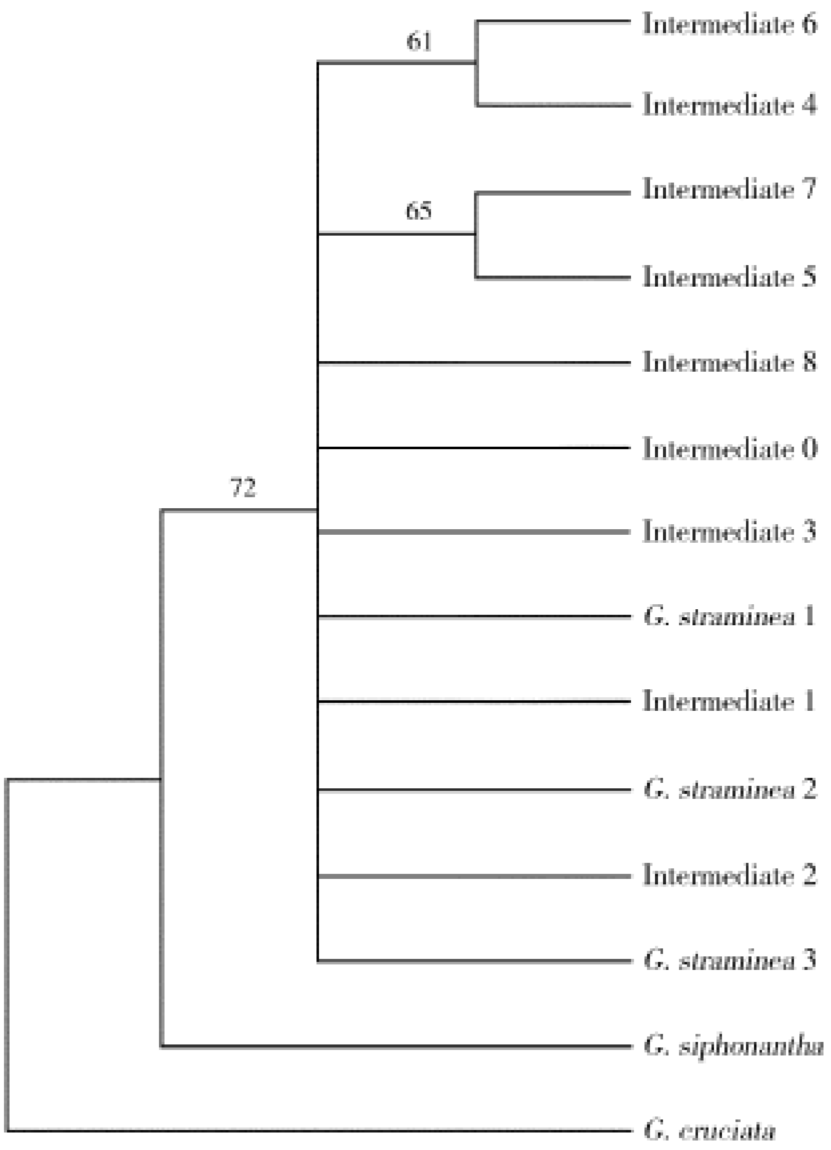

图 2　基于 *ITS* 序列分析得到的唯一最简约树。分支上的数据为自展分析支持率（bootstrap 值，1000 次重复）

Fig. 2　The single maximum parsimonious (MP) tree based on *ITS* sequences. Numbers above internodes are bootstrap values based on 1000 replicates

管花秦艽，因而两个物种互为母本的杂交后代。

在 *ITS* 序列中，两个亲本种管花秦艽与麻花艽之间存在 5 个碱基的替换和 3 个碱基的插入或者缺失（表 1）。核糖体 *ITS* 基因是双亲遗传，如果形态上的过渡个体是杂交或者渗入造成的，则应该在这些个体直接测序中发现由于杂交而来自双亲的位点叠加性（additivity）（Wendel 等，1995）。我们对 *ITS* 直接测序的研究结果发现：仅一个体（961 - 4）与麻花艽的一种序列（*ITS*-st-A）完全相同，另一个体（961 - 6）是麻花艽另两种序列（*ITS*-st-B 和 *ITS*-st-C）的组合，这两个个体不具有两个亲本种之间的杂交组合特征；其余的 16 个个体都拥有两个物种 5 个替换差异位点中 3 个以上位点的粘合性重叠。此外，我们对形态中间类型一个一个的 *ITS* 序列进行克隆分析的结果也支持其杂交起源的假设。

综合考虑两套分子标记的结果，只有 2 个个体（961 - 4 和 961 - 6）不具有两个亲本种的两套分子标记特征；其余个体都拥有两个种的特征分子标记；结合形态特征的中间性质，可以初步判断这些形态中间个体中的大部分是两个物种自然杂交的后代。而少数个体（961 - 4 和 961 - 6）形态上位于两个物种之间，但在分子上没有检测到另一假设亲本的分子标记，可能是因为：(1) 这些个体在最初的杂交中，是以麻花艽为母本，因而在母系标记的叶绿体 *trn*S-G 序列上可能没有变异；(2) 它们可能与母本存在反复的回交，从而导致了多拷贝的 *ITS* 序列向母本麻花艽的趋同进化，造成了与麻花艽完全一致的序列，因而不能检测到另一亲本种的遗传痕迹（genetic signature)。但是，这些假设还需要进一步验证。*ITS* 位点在杂交后代中存在趋同进化，而单拷贝基因则不存在这种情况；因此，在将来的研究中仍然需要发展单拷贝基因序列或者片段来检查这些杂交后代是 F1 还是 F2 代以及形态鉴定和遗传标记之间的一致性。

3.2 杂交过渡带两个亲本种 DNA 序列的变异

在 ITS 序列中，除形态中间个体外，麻花艽的部分个体在三个位点上（55，188 和 549）发生了重叠粘和性。造成这种差异的可能原因之一是由于 PCR 扩增误差造成的，但多个个体和多次重复都发生了这种情况，说明这一位点的变化是真实存在的。但是，麻花艽所有个体的 *trn*S-G 序列却十分一致。*ITS* 发生重叠粘和性的相应位点没有出现在管花秦艽的所有个体中。麻花艽中的这一变化可能是通过杂交带从管花秦艽而来的假设不能成立。我们推测造成这一变异的原因还有待进一步研究。

尽管 *ITS* 序列在个体间十分一致，但管花秦艽的 *trn*S-G 序列也出现了较大的变异，其中 St-si 类型只与麻花艽存在一个碱基的变化，并且这一碱基正好与 Si 类型相同；另一类型的变异似乎也与麻花艽相关（表 1)。管花秦艽的 3 种单倍型也同样在形态过渡的杂交疑似个体中发现。对于管花秦艽中发现的 3 种单倍型同样可能有如下原因：(1) 管花秦艽与麻花艽在早期物种分化谱系中保留的祖先类型；(2) St-Si 和 Si-st 型是两个物种分化以后再发生的趋同变化；(3) 杂交导致了叶绿体基因组的重组，这两种单倍型首先在杂交个体中出现，然后与管花秦艽回交，使得形态和 *ITS* 都类似管花秦艽。但是，这些假设还需要对这两个物种异域分布的居群以及更多的 DNA 片段进行分析之后才能准确判断。

总之，我们通过群体取样的方法在杂交带亲本物种内个体间发现了不同的 DNA 序列；这些个体之间的差异可能是由于亲本种本身谱系筛选不彻底以及由于杂交而发生重组造成的。我们还发现形态特征鉴定的亲本种、杂交个体与分子标记往往不是十分吻合；这可能主要是由于回交与渗入造成的大量形态变异以及分子标记（如 *ITS*) 的趋同进化等原因造成的；这一现象也存在于在其它具有杂交现象的类群中（Tsukaya 等，2003)。这些发现说明仅形态或者分子证据难以确定每一个体的杂交起源性质。此外，我们的发现对分子系统学研究也具有重要的参考价值。在分子系统学研究中，经常利用一个体来代表一物种进行系统发育树重建；如果采集的材料来自杂交带地区，则有可能因为杂交导致的变异而影响物种亲缘关系的准确建立。我们建议在今后的分子系统学研究，研究材料尽量避免来自两个物种同域分布的地区，每个物种尽量采集不同地区更多的个体作为代表。

致谢 何廷农教授帮助鉴定标本，本实验室王玉金博士在数据分析中给予了许多帮助。

〔参 考 文 献〕

Arnold ML，1997. Natural Hybridization and Evolution [M]. New York: Oxford University Press

Arnold ML，Bouck AC，Cornman RS，2003. Verne Grant and Louisiana irises: is there anything new under the sun [J]. *New Phytol*，**161**: 143—149

Chen SY（陈生云)，Chen SL（陈世龙)，Xia T（夏涛）*et al*. 2005. Phylogeny of *Metagentiana* and related genera (Gentianaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS sequences [J]. *Acta Phytotax Sin*（植物分类学报)，**43**: 491—502

Doyle JJ，Doyle JL，1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*，**19**: 11—15

Ellstrand NC，Whitkus RW，Rieseberg LH，1996. Distribution of spontaneous plant hybrids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*，**93**: 5090—5093

Ferris C, King RA, Gray AJ, 1997. Molecular evidence for the maternal parentage in the hybrid origin of *Spartina anglica* C. E Hubbard [J]. *Mol Ecol*, **6**: 185—187

Grant V, 1981. Plant Speciation [M]. New York: Columbia University Press, USA

Hamilton MB, 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation [J]. *Mol Ecol*, **8**: 521—523

Ho TN (**何廷农**), Liu SW (**刘尚武**), 2001. A Worldwide Monograph of Gentiana [M]. Beijing: Science Press

Koch MA, Dobes C, Mitchell-Olds T, 2003. Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (*ITS*) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae) [J]. *Mol Biol Evol*, **20**: 338—350

Lexer C, Welch M, Raymond O *et al*. 2003. The origins of ecological divergence in *Helianthus paradoxus* (Asteraceae): Selection on transgressive characters in a novel hybrid habitat [J]. *Evolution*, **57**: 1989—2000

Liu JQ, Wang YJ, Wang AL *et al*. 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremanthodium-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **38**: 31—49

Mansiona G, Struwe L, 2004. Generic delimitation and phylogenetic relationships within the subtribe Chironiinae (Chironieae: Gentianaceae), with special reference to *Centaurium*: evidence from nrDNA and cpDNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **32**: 951—977

Mogensen HL, 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants [J]. *Amer J Bot*, **83**: 383—404

Pringle JS, 1966. Hybridization in *Gentiana* (Gentianaceae): a resume of J. T. Curtis′ studies [J]. *Trans Wisconsin Acad Sci*, **54**: 283—293

Rauscher JT, Doyle JJ, Brown AHD, 2002. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex [J]. *Mol Ecol*, **11**: 2691—2702

Rieseberg LH, 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins [J]. *Amer J Bot*, **82**: 944—944

Rieseberg LH, Carney SE, 1998. Plant Hybridization [J]. *New Phytol*, **140**: 599—624

Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK, 1999. Transgressive segregation, adaptation, and speciation [J]. *Heredity*, **83**: 363—372

Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM *et al*. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization [J]. *Science*, **301**: 1211—1216

Rieseberg LH, Wood TE, Baack EJ, 2006. Nature of plant species [J]. *Nature*, **440**: 524—527

Schwarzbach AE, Donovan LA, Rieseberg LH, 2001. Transgressive character expression in a hybrid sunflower species [J]. *Amer J Bot*, **88**: 270—277

Stebbins GL, 1959. The role of hybridization in evolution [J]. *Proc Amer Phil Soc*, **103**: 231—251

Swofford DL, 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (3 and Other Methods). Version 4 [M]. Sunderland: Sinauer Associates

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al*. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4876—4882

Tsukaya H, Fukuda T, Yokoyama J, 2003. Hybridization and introgression between *Callicarpa japonica* and *C. mollis* (Verbenaceae) in central Japan as inferred from nuclear and chloroplast DNA sequences [J]. *Mol Ecol*, **12**: 3003—3011

Wang YJ (**王玉金**), Li XJ (**李小娟**), Hao G (**郝刚**) *et al*. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of *Androsace* (Primulaceae) and the convergent evolution of cushion morphology [J]. *Acta Phytotax Sin* (**植物分类学报**), **42**: 481—499

Wang AL, Yang MH, Liu JQ, 2005. Molecular Phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the Rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA *trn*L-F sequences [J]. *Ann Bot*, **96**: 489—498

Wendel JF, Schnabel A, Seelanen T, 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 280—284

White TJ, Bruns T, Lee S *et al*. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J *et al*. eds., PCR protocols: A Guide to Methods and Application [M]. San Diego: Academic Press, 315—322

Yuan CC (**袁长春**), Li PX (**黎培新**), Wang YF (**王燕芳**) *et al*. 2004. The confirmation of putative natural hybrid species *Meconopsis* × *cookei* G. Taylor (Papaveraceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS region sequence [J]. *Acta Genet Sin* (**遗传学报**), **31** (9): 901—907

Zhang Q (**张茜**), Yang R (**杨瑞**), Wang Q (**王钦**) *et al*. 2005. Phylogeography of *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from the chloroplast DNA *trn*T-*trn*F sequence variation [J]. *Acta Phytotax Sin* (**植物分类学报**), **43** (6): 503—512